

Detecção de anticorpos contra o vírus da parainfluenza bovina tipo 3 (pi-3) e o vírus da leucose bovina (vlb) em bovinos de diferentes municípios do Estado da Bahia, Brasil

Detection of antibodies against bovine parainfluenza type 3 virus (pi-3) and bovine leukemia virus (blv) in bovines from different counties of Bahia State, Brazil

SÍLVIA INÊS SARDI¹, GÚBIO SOARES CAMPOS², SÍLVIA BONFIM BARROS³, GABRIELA LORENS EDELWEISS⁴, DELANE TIGRE MARTINS⁵

¹ Professora de Microbiologia. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

² Farmacêutico Bioquímico. Pesquisador. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

³ Monitora. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA

⁴ Pesquisadora. EBDA. Governo do Estado da Bahia

⁵ Mestranda. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde. UFBA.

Resumo

Neste trabalho, foi avaliada a pesquisa de anticorpos contra o vírus da parainfluenza bovina tipo 3 (PI-3) e o vírus da leucose bovina (VLB), em seis municípios do Estado da Bahia, através de uma amostragem sorológica de 187 bovinos de 1 a 4 anos, sem antecedentes clínicos, vacinação ou diagnóstico laboratorial das doenças em estudo. Do total dos 187 soros analisados para a detecção de anticorpos contra o vírus de PI-3, utilizando a técnica de inibição da hemoaglutinação, 59 soros foram negativos (31,5%) e 128 soros foram positivos (68,5%). Dos 128 soros positivos, 42 soros mostraram ter 80 UIHA, 67 soros, 160-320 UIHA e 11 soros um valor maior do que ou igual a 640 UIHA. Os resultados para VLB, detectados pela técnica de ELISA de uso comercial, mostraram que, dos 187 soros, somente 14 foram positivos (7,5%). Os resultados obtidos são discutidos no trabalho.

Palavras-chave

Parainfluenza bovina tipo 3, leucose bovina, diagnóstico, sorologia

Prof^a Sílvia Inês Sardi
Laboratório de Virologia
Departamento de Biointeração
Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Bahia
Av. Reitor Miguel Calmon s/n Vale do Canela
40.110-100 Salvador, Bahia, Brasil
e-mail: labviro@svn.com.br

Introdução

O vírus da parainfluenza bovina tipo 3 (PI-3) é da família dos *Paramixoviridae*, gênero *Paramixovirus*. É um vírus ARN, com envelope, que possui a proteína de F (Fusão) e duas glicoproteínas denominadas hemaglutinina e neuroaminidase (FIELDS, 1996). A hemaglutinina tem a propriedade de unir-se a hemácias de diferentes espécies animais e formar uma rede de hemácias-vírus, ficando em suspensão.

O vírus PI-3 afeta bovinos jovens ou ovelhas desenvolvendo, comumente, uma doença respiratória aguda, associada a situações de tensão ou estresse. A infecção é caracterizada por febre, lacrimejo, descarga nasal serosa, depressão, dispnéia e tosse. Alguns animais podem desenvolver uma pneumonia intersticial inicial, na qual a consolidação da inflamação está usualmente presente só nos lóbulos anteriores dos pulmões. A infecção respiratória sem complicações causada por PI-3 cursa de três a quatro dias com uma completa recuperação (MURPHY et al., 1999). Entretanto, em condições de estresse, alguns bovinos ou ovelhas desenvolvem uma pneumonia intersticial: a “febre do embarque”. O papel do PI-3 na febre do embarque sempre causou atenção e controvérsia. Por febre do embarque se designa um quadro sintomatológico caracterizado por pneumonia aguda que responde a uma complexa identidade etiológica de tipo viral-bacteriano que atua sinergicamente ou como conseqüência (YATES, 1982). O vírus PI-3 está comumente implicado nestes quadros e sua atividade patogênica inicial e individual são determinantes na produção de pneumonias em bezerras e ovelhas.

O vírus da leucose bovina (VLB) é um retrovírus do gênero dos oncovírus, ARN de cadeia simples com envelope. Este vírus causa uma neoplasia altamente fatal em bovinos, caracterizada por agregação de linfócitos neoplásicos nos linfonódulos. Os sinais clínicos estão comumente associados a perda de peso, menor produção de leite, linfadenopatia e paresia posterior. Uma vez adquirida a doença, a infecção viral torna-se persistente a vida toda e pode se disseminar, por contato, por outros animais.

A transmissão do agente ocorre, principalmente, de forma horizontal, pela transferência de linfócitos infectados e contato entre animais adultos (PIPER; FERRER; MARSHAK, 1979), embora a transmissão placentária aos fetos ocorra em um pequeno número de casos (VAN DER MAATEN; MILLER; SCHMERR, 1981). A maioria dos animais adquire a infecção a partir dos dois anos de idade, quando, por questões de manejo, passam a conviver com o rebanho adulto. Diversos estudos sorológicos têm demonstrado a presença de infecção pelo VLB em vários estados do Brasil (FLORES et al., 1989; GOMES et al., 1985; KANTEK-NAVARRO; KRUGER; WELTE, 1982; ROMERO; ROWE, 1981). Como todos os bovinos infectados desenvolvem anticorpos e permanecem portadores do vírus, a detecção dos mesmos através de técnicas sorológicas é considerada evidência de infecção (FERRER, 1979). A técnica de imunodifusão gel de ágar (IDGA) e antígeno glicoprotéico é a prova mais utilizada no diagnóstico de infecção (MILLER; VAN DER MAATEN, 1977), embora seja pouco sensível. Outra técnica de uso e de alta sensibilidade é o ELISA, cujo kit comercial pode ser adquirido no mercado.

O objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença de anticorpos contra estas duas doenças de interesse para a sanidade dos rodeios e pouco estudadas na Bahia. Os únicos dados epidemiológicos reportam-se aos anos de 1982 e 1987 para PI-3 (GALVÃO; RIBEIRO, 1982; RIBEIRO et al., 1987) e, para o VLB, ao ano de 1990 (TÁVORA, 1990), não havendo dados bibliográficos atualizados, daí o interesse do nosso laboratório em pesquisar estas duas viroses através de uma amostragem sorológica de bovinos de diferentes fazendas e municípios do Estado da Bahia.

Materiais e métodos

Células

Foram utilizadas as células de origem bovina Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) livres de pestivirus (diarréia viral bovina). O meio de crescimento foi MEM-E (Gibco), suplementado com 7% de soro equino (Cultilab). As células MDBK foram cultivadas a 37°C em gar-

rafas de 125 cm² de capacidade (NUNC) e usadas após 24 horas do tempo de cultura.

Vírus

O vírus PI-3 utilizado nos experimentos foi a cepa SF-4 (National Veterinary Services Laboratories-Iowa-U. S. A). O vírus foi propagado a uma MOI=1 em células MDBK, e coletado após efeito citopático total a 48-72 horas de efetuada a infecção. As células e o sobrenadante foram congelados a -20°C, descongelados a 37°C e, posteriormente centrifugados a 5.000g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante (suspensão de vírus) foi coletado, fracionado e congelado a -70°C até seu uso.

Amostras

Foram coletadas 187 amostras de soro de bovinos entre um a quatro anos provenientes de seis fazendas. O número coletado deveria representar um mínimo de 10% da população bovina da fazenda.

As fazendas do Estado da Bahia localizam-se nos municípios de Conde, Macajuba, Vitória da Conquista, Itamaraju, Feira de Santana e Ruy Barbosa e foram escolhidas segundo os antecedentes clínicos do rebanho, não devendo apresentar histórico de vacinação, diagnóstico clínico ou laboratorial prévio das doenças em estudo.

Os soros coletados foram fracionados e congelados a -20 °C até seu uso.

Técnica de hemaglutinação – titulação de vírus

Foi utilizada a técnica descrita por Carbrej (1964). Utilizou-se uma placa fundo U e colocou-se em todos os poços uma solução de PBS (0,050 ml). O vírus a titular (0,050 ml) foi diluído base dupla e adicionou-se uma suspensão 1:120 (0.050 ml) de hemácias bovinas (livres de anticorpos contra PI-3) previamente lavadas três vezes com PBS. A placa levada a uma temperatura de 4-10°C foi lida após quatro horas. A titulação do vírus foi expressa em unidades

hemaglutinantes (UHA), que é a inversa da última diluição em que se observa hemaglutinação.

Detecção de anticorpos contra o vírus PI-3

Para a detecção de anticorpos contra PI-3, utilizou-se a técnica de inibição da hemaglutinação (CARBREY, 1964). Brevemente, a técnica foi realizada com o vírus PI-3 com título de 8 UHA, com soros inativados a 56°C durante 30 minutos, posteriormente tratados com Kaolín (4 mg/ml), e diluídos base dupla desde 1:5 até 1:640. As hemácias de origem bovina (livres de anticorpos contra PI-3) foram usadas na diluição de 1:120. A placa de fundo U misturada com soro-vírus foi incubada à temperatura ambiente durante uma hora; posteriormente, foi adicionada a diluição de hemácias e incubada por quatro horas a 4°C. Os resultados foram expressos como unidades inibidoras da hemaglutinação (UIHA), considerando-se, abaixo de 40 UIHA, negativo; 40-80 UIHA, positivo; 320 UIHA, exposição prévia ao vírus; e superior a 640 UIHA, infecção recente.

Detecção de anticorpos contra o VLB: técnica ELISA

Para a detecção de anticorpos contra o VLB utilizou-se o teste de ELISA Anti-VLB Herd-Check-IDDEX, seguindo-se as instruções e a interpretação de resultados segundo o fabricante.

Resultados e discussão

Os resultados para detecção de anticorpos contra PI-3 mostraram que as seis fazendas apresentaram sorologia positiva. A maioria teve 50% de soropositivos na amostragem dos bovinos do rebanho.

Do total dos 187 soros analisados para a detecção de anticorpos contra o vírus de PI-3, 59 foram negativos (31,5%) e 128 positivos (68,5%) (QUADRO 1).

QUADRO 1

Resultados da detecção de anticorpos contra o vírus da parainfluenza bovina tipo 3 e da leucose bovina

FAZENDA NÚMERO	VÍRUS PARAINFLUENZA 3 BOVINA		VÍRUS LEUCOSE BOVINA	
	ANIMAIS SORO- POSITIVOS	ANIMAIS SORO- NEGATIVOS	ANIMAIS SORO- POSITIVOS	ANIMAIS SORO- NEGATIVOS
1	17	6	6	17
2	34	3	3	34
3	18	20	0	38
4	35	10	0	45
5	11	13	5	19
6	13	7	0	20
Total	128	59	14	173

Do total dos 128 soros positivos, 42 soros mostraram ter 80 UIHA, 67 soros, 160-320 UIHA, e 11 soros, valor maior do que ou igual a 640 UIHA (QUADRO 2).

QUADRO 2

Resultados da titulação de anticorpos pela técnica de inibição da hemaglutinação para o vírus da parainfluenza bovina tipo 3

FAZENDA NÚMERO	80 UIHA* (n=)**	160-320 UIHA (n=)	≥640 UIHA (n=)	NEGATIVOS (n=)	TOTAL
1	8	7	2	6	23
2	13	16	5	3	37
3	6	12	0	20	38
4	10	17	8	10	45
5	1	6	4	13	24
6	4	9	0	7	20

* UIHA: unidades inibidoras da hemaglutinação

** (n=): número de animais

No QUADRO 1, apresentam-se os resultados para VLB. Nele se demonstra que, dos 187 soros, somente 14 foram positivos (7,5%), correspondentes a três fazendas.

Havendo-se processado um número pequeno de amostras, constatou-se um alto número de positivas para o vírus PI-3. Este é um vírus

que causa uma sintomatologia respiratória que, às vezes, pode passar despercebida. A instalação da infecção bacteriana secundária leva a um quadro clínico mais severo, com sinais clínicos evidentes, fazendo com que a etiologia viral primária pelo vírus PI-3 seja mascarada. Portanto, a justificativa do alto número de positivos pode se dever a isto. Por outro lado, desde o último informe em 1987, que revelou 5% na região de Itaberaba e Ruy Barbosa, observa-se, como era de esperar, um avanço na difusão do vírus.

No caso da VLB, é mais comum a infecção se manifestar a partir dos dois anos de idade e continuar de forma progressiva, o que poderia justificar o baixo número de positivos deste estudo. O último informe de Távora (1990) em seu estudo sobre bovinos de leite na região de Itabuna menciona uma prevalência de 35% em bovinos adultos.

Conclusões

Concluindo, destaca-se o alto número de soropositivos contra PI-3. Considerando que é uma doença que afeta bezerras, deve-se analisar mais exaustivamente e incluir no diagnóstico a possível presença deste vírus como agente causador de problemas respiratórios nos rebanhos jovens. Embora seja necessário analisar um maior número de amostras para determinar a prevalência destas duas viroses, nosso estudo abrangeu diferentes municípios do Estado, rebanhos sem antecedentes de vacinação ou diagnóstico confirmado, uma faixa etária jovem, e utilizou testes sorológicos altamente sensíveis, esperando-se que os resultados obtidos sejam altamente confiáveis.

Agradecimentos

À FAPESB, pelo apoio ao Laboratório de Virologia, e à Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia.

Abstract

This work aimed at evaluating antibodies against bovine parainfluenza type 3 (PI-3) and bovine leukemia (BLV) viruses in six counties from the state of Bahia. The samples were bovines, at 1-4 years old, without any previous clinical records, vaccination or laboratory diagnose backgrounds of the illness. From the 187 sera sample analyzed by the haemagglutination test for PI-3, 128 were seropositive (68,5%) and 59

sera (31,5%) negative. The 128 seropositive results showed that 42 sera had 80 IUHA, 67 sera 160-320 IUHA and 11 sera equal or greater than 640 IUHA. The results for BLV using an ELISA commercial test showed 14 seropositive ones (7,5 %) from the 187 sera samples analyzed. The results obtained are discussed in this paper.

Key words

Parainfluenza type 3, bovine leukemia virus, diagnose-serology

Referências

- CARBREY, E. A. Diagnosis of viral diseases, resources in virology for veterinary diagnostic laboratories, U. S. Department of Agriculture. *Proc. Annu. Meet. U. S. Anim. Health Assoc.*, n. 68, p. 393-396, 1964.
- FERRER, J. F. Bovine leukosis: natural transmission and principles of control. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 175, n. 12, p. 1281-1286, 1979.
- FIELDS, B. *Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.
- FLORES, E. F. et al. Prevalência de anticorpos contra o vírus da leucose bovina (VLB) no rebanho leiteiro de Santa Maria. *Rev. Centro de Ciências Rurais*, Santa Maria, n. 18, p. 2-3, 1989.
- GALVÃO, C.; RIBEIRO, M. B. Prevalência de anticorpos para o vírus da Parainfluenza tipo 3 em bovinos jovens na MRH Piemonte da Diamantina, no Estado da Bahia. *EPABA*, n. 1, dez. 1982.
- GOMES, M. et al. Detecção de anticorpos séricos contra o vírus da leucose bovina (VLB) em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. *Arq. Fac. Vet.*, UFRGS, Porto Alegre, n. 13, p. 15-22, 1985.
- KANTEK-NAVARRO, C. E.; KRUGER, E. R.; WELTE, V. R. Infecção com o vírus da leucose enzoótica bovina em um lote de vacas produtoras de leite importadas do Uruguai. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 2, n. 3, p. 125-126, 1982.
- MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Europ. J. Cancer*, n. 13, p. 1369-1375, 1977.
- MURPHY, F. et al. *Veterinary virology*. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1999.
- PIPER, C. E.; FERRER, J. F.; MARSHAK, P. R. Post-natal and prenatal transmission of the bovine leukemia virus under natural conditions. *J. Natl. Cancer Inst.*, n. 62, p. 165-168, 1979.
- RIBEIRO, M. et al. Infecções pelos vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina/vulvovaginite pustular infecciosa, diarreia viral bovina e parainfluenza 3, detectadas por meio de avaliação sorológica no Estado da Bahia. *EPABA. Doc.*, n. 11, p. 5-30, jan. 1987.
- ROMERO, C. H.; ROWE, C. A. Enzootic bovine leukosis in Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.*, n. 13, p. 107-111, 1981.
- TÁVORA, J. P. F. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose bovina em rebanhos leiteiros criados na região do pólo de Itabuna, Estado da Bahia. 1990. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- VAN DER MAATEN, M. J.; MILLER, J. M.; SCHMERR, M. J. *In utero* transmission of bovine leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.*, v. 46, n. 6, p. 1052-1054, 1981.
- YATES, W. D. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral bacteria synergism in respiratory disease. *Can. J. Comp. Med.*, n. 46, p. 225, 1982.